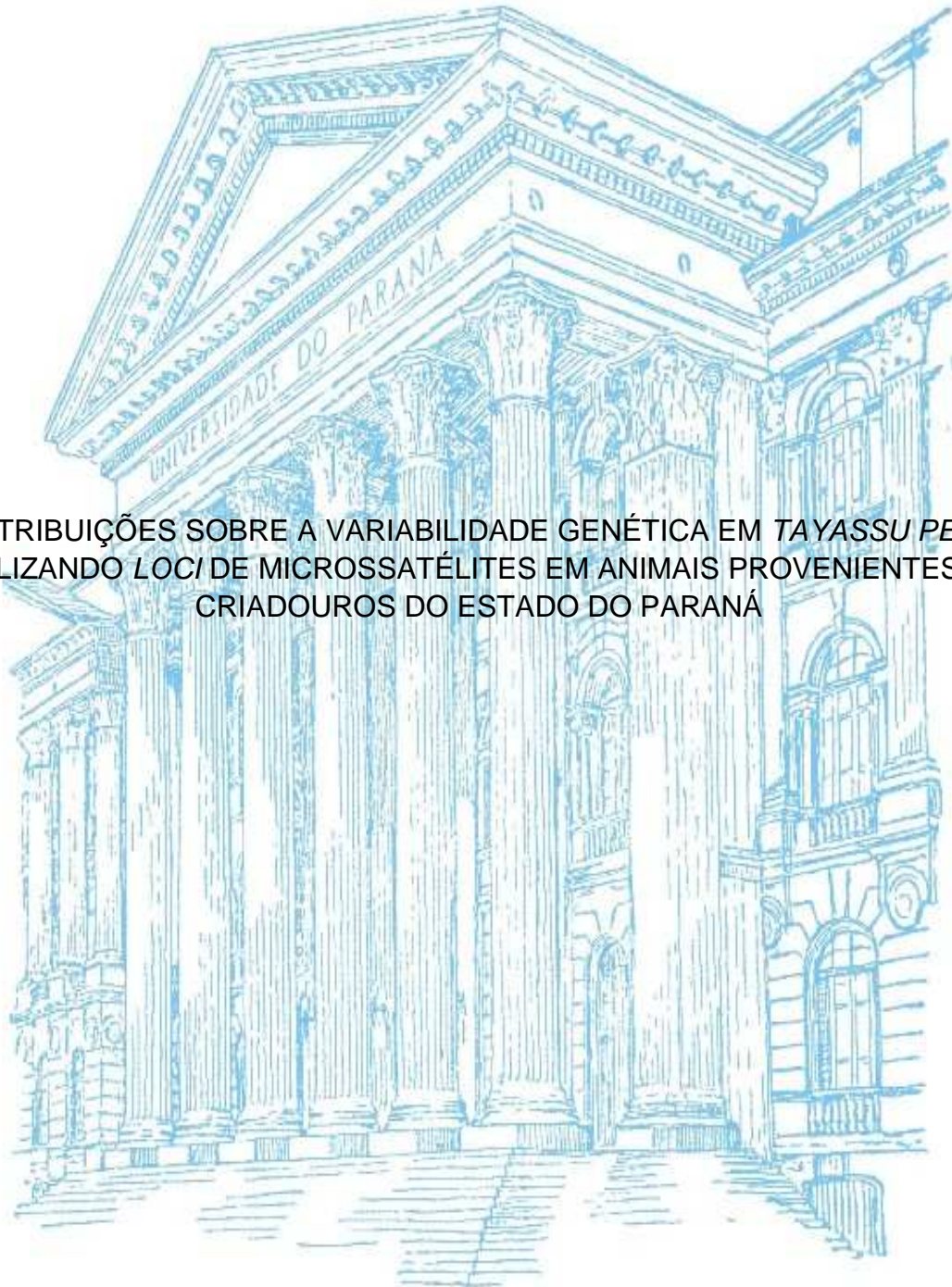


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE CRISTINA RODRIGUES DE ALCANTARA

CONTRIBUIÇÕES SOBRE A VARIABILIDADE GENÉTICA EM *TAYASSU PECARI*
UTILIZANDO LOCI DE MICROSSATÉLITES EM ANIMAIS PROVENIENTES DE
CRIADOUROS DO ESTADO DO PARANÁ



CURITIBA

2013

JAQUELINE CRISTINA RODRIGUES DE ALCANTARA

CONTRIBUIÇÕES SOBRE A VARIABILIDADE GENÉTICA EM *TAYASSU PECARI*
UTILIZANDO *LOCI* DE MICROSSATÉLITES EM ANIMAIS PROVENIENTES DE
CRIADOUROS DO ESTADO DO PARANÁ

Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Genética como requisito à
conclusão do grau de bacharel, do
Curso de Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iris Hass

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, autor da vida, por me permitir chegar até aqui.

Ao meu esposo Delmar, pelo seu apoio incondicional, pela sua compreensão nos momentos difíceis e por não ter me deixado desistir do meu sonho de ser bióloga. Sem o seu incentivo e sem o seu amor eu não teria chegado ao fim desta longa caminhada. Jamais poderei agradecer por tudo o que fez por mim.

Agradeço o apoio de meus familiares e meus amigos, sempre com palavras de incentivo, me dando forças para continuar.

À Prof^a Dr^a Iris Hass, pela orientação, apoio, amizade e compreensão durante todos esses anos, e também ao Prof^o Dr. Ives Sbalqueiro, pela oportunidade que ambos me deram de trabalhar em sua equipe.

Aos tantos professores que fizeram parte desta jornada.

Aos colegas Caroline Banach e Adriano Targa, sempre tão presentes na minha vida, pelas longas risadas trocadas e também pelos momentos de estresse vividos, e pela saudade que deixaram depois que retornei à faculdade.

Aos colegas de laboratório Marina, Marília, Luana, Aline, Shenian e Willian, pelo companheirismo e pelos momentos de ajuda e descontração passados no laboratório.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

E por último, mas não menos importante, agradeço e dedico esta monografia à minha filha Marcela, a minha “princesa do sonho”, o anjo que Deus enviou para iluminar meu caminho, para colorir os meus dias; meu motivo para continuar, mesmo quando o coração apertava de saudade, seu sorriso era minha fonte de inspiração! Você também contribuiu para a realização desse trabalho, minha pequena.

RESUMO

Tayassu pecari é uma espécie de porco do mato, também conhecida como queixada, que é encontrada na América do Sul e está ameaçada de extinção devido à caça e destruição do seu habitat natural. Pelo fato de serem utilizados na alimentação e também de sua carne ser muito saborosa, estes animais vem sendo criados em cativeiros. Pouco se sabe sobre as características genéticas desta espécie, portanto é importante realizar um estudo sobre sua variabilidade genética, procurando meios para minimizar possíveis alterações na diversidade genética causada pela condição de cativeiro. A análise da variabilidade pode ser estudada através da utilização de loci de microssatélites, e neste trabalho foram compilados dados de vários experimentos do laboratório de Citogenética Animal, os quais utilizaram iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (porco doméstico), em animais provenientes de dois criadouros do Paraná. Amostras de sangue foram coletadas e o DNA extraído foi amplificado através da PCR, em seguida visualizado em gel de poliacrilamida e revelado em nitrato de prata. Após este procedimento, foram utilizados dois softwares: GDA (utilizado para calcular a Heterozigosidade Esperada e Observada, e o coeficiente de endocruzamento) e Arlequin (utilizado para calcular o F_{st} , para dizer se há estruturação dentro da população). Assim verificou-se que a maioria dos indivíduos estudados amplificou alelos em homozigose, sendo que a Heterozigosidade Esperada foi 0,64 (média das duas populações) enquanto que a Heterozigosidade Observada foi de 0,16, resultando no número de indivíduos homozigotos maior que o esperado. Em relação à estatística F obteve-se $F_{is}=0,21$, resultado que indica que está ocorrendo endocruzamento. O presente trabalho verificou que a taxa de indivíduos homozigotos é elevada nas duas populações, o que pode ser explicado pelo fato de serem animais criados em cativeiro, sendo importante estabelecer medidas de manejo nos criadouros, como a permuta de indivíduos, para permitir a troca de alelos nas sub-populações e evitar a perda da variabilidade genética.

Palavras chave: *Tayassu pecari*. Microssatélites. Variabilidade genética. Cativeiros (PR).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da ocorrência atual dos queixadas	9
Figura 2 - <i>Tayassu pecari</i> (queixada).....	16
Figura 3 - Exemplo de gel de poliacrilamida, com amplificação de nove alelos e nenhum indivíduo heterozigoto.....	27
Figura 4 - Exemplo de gel de poliacrilamida, com amplificação de cinco alelos, um indivíduo heterozigoto.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de indivíduos, sexo e localidades das amostras dos queixadas	22
Tabela 2 – Sequência dos iniciadores, localização cromossômica na espécie de <i>Sus scrofa domestica</i>	25
Tabela 3 – Concentração e volume do mix da PCR	29
Tabela 4 – Tamanho dos fragmentos e número de alelos amplificados em <i>Tayassu pecari</i>	29
Tabela 5 – Valores de Heterozigosidade Esperada e Observada nas duas populações, para todos os indivíduos	30
Tabela 6 – Valores de heterozigosidade esperada e observada nas duas populações, somente para os indivíduos que apresentaram resultado de amplificação.....	31
Tabela 7 – Alelos específicos de cada população	32
Tabela 8 – Polimorfismo genético encontrado em cada população.....	33
Tabela 9 – Polimorfismo genético encontrado em cada loco.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	Ordem Artiodactyla	13
3.2	Família Tayassuidae	14
3.3	<i>Tayassu pecari</i>	14
3.4	Marcadores Moleculares	17
3.5	Microsatélites.....	18
3.6	Estudos com Marcadores Moleculares em Tayassuidae	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	Amostra	22
4.2	Extração de DNA.....	23
4.3	Qualificação, Quantificação e Diluição do DNA Extraído	24
4.4	Amplificação dos Locos Microsatélites	25
4.5	Visualização dos Produtos de Amplificação	26
4.6	Análises dos Dados.....	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Análise dos Dados.....	30
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO	43

1 INTRODUÇÃO

Tayassu pecari (Link 1975), é uma espécie de mamífero pertencente à família Tayassuidae. É conhecida popularmente pelo nome “queixada”, devido ao costume de bater violentamente o queixo, quando se sente acuada.

Seus representantes também são conhecidos como porcos-do-mato, mas não pertencem à família Suidae, da qual fazem parte o porco-doméstico e o javali, entre outros, pois apresentam algumas diferenças, como por exemplo, estômago com dois compartimentos, pêlos mais compridos e rijos, cauda mais curta e abertura de uma glândula de cheiro nas costas, um pouco à frente da cauda. Possui pernas longas e finas; os pés anteriores apresentam quatro dedos, dos quais apenas dois tocam o chão; os posteriores portam três dedos (SILVA, 1984).

No Brasil, além de *Tayassu pecari*, ocorre também a espécie *Tayassu tajacu* (cateto). Ambas as espécies estão sendo amplamente criadas em cativeiro devido à exploração econômica da carne, que além de ser muito saborosa apresenta o teor de gordura inferior à dos porcos domésticos. O couro destes animais é usado em confecções finas como luvas e bolsas (DEUTSCH e PUGLIA, 1990).

Os queixadas têm um papel muito importante no desenvolvimento econômico e cultural de muitas populações, pois constituem uma importante fonte alimentar e de renda para diversas tribos indígenas e populações rurais (MARCH, 1993).

O *T. pecari* está entre os animais em perigo de extinção devido à caça extensiva, problemas de saúde (especialmente doenças infecciosas) e desaparecimento das florestas onde vivem.

Segundo a IUCN (International Union for Conservation of Nature), a distribuição dos queixadas atualmente está descrita a seguir (Figura 1):

Figura 1 - Mapa da ocorrência atual dos queixadas



Fonte: The IUCN Red List of Threatened Species, 2012.1.

A IUCN reconhece a necessidade de conservar a diversidade genética como uma das prioridades globais de conservação. A diversidade genética é proporcional ao tamanho populacional, inversamente proporcional à endogamia, e requerida para as populações e espécies se adaptarem às mudanças ambientais, refletindo seu potencial evolutivo (FRANKHAM *et al.*, 2002). Conseqüentemente, a baixa diversidade genética é vista como um marcador de risco de extinção (SPIELMAN *et al.*, 2004, *apud* BANHOS, 2009).

Uma vez que a diversidade genética está geralmente associada com a endogamia e redução geral de reprodução e sobrevivência, os programas de

reprodução em cativeiro e manejo da vida silvestre são de grande importância, pois reconhecem a necessidade de minimizar a perda de diversidade genética e a endogamia (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Assim, o conhecimento da biologia de espécies é de considerável interesse para a conservação (BANHOS, 2009). Em um esforço conjunto com ecologia e morfologia, os dados genéticos podem ser usados para definir as unidades que serão o alvo da conservação. As metas da conservação são, a longo prazo, evitar a endogamia em espécies que não são naturalmente endogâmicas e permitir a elas a manutenção do maior potencial evolutivo possível, ou seja, manter sua alta diversidade genética, independente de sua fragmentação atual. É possível fazer isso realizando a análise genética das populações, incluindo a identificação da sua estrutura genética e dos fatores que a afetam, como por exemplo, tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento (PEREZ-SWEENEY, RODRIGUES e MELNICK, 2004). Portanto, a avaliação da estrutura genética populacional inclui medidas da endogamia, diversidade e diferenciação, fornecendo um retrato genético das populações.

Com relação à endogamia, um dos principais motivos para evitá-la é o de prevenir um aumento de indivíduos homozigotos para genes recessivos deletérios ou letais na população. Esses efeitos poderiam levar a população a sofrer os efeitos de um fenômeno conhecido como depressão endogâmica. (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Mas em populações pequenas, que é o caso das estudadas neste trabalho (criadas em cativeiros), o endocruzamento e a perda de diversidade genética são inevitáveis. Em curto prazo elas reduzem a reprodução e a sobrevivência e, em longo prazo, diminuem a capacidade das populações evoluírem em resposta às mudanças ambientais, aumentando o risco de extinção.

Em habitat natural, os queixadas vivem em grandes grupos, onde a rotatividade do “macho alfa” (para reprodução) é maior. Já em cativeiros esses grupos diminuem, favorecendo o cruzamento entre poucos indivíduos, elevando a endogamia.

Para saber a situação das populações de cada criadouro, é necessário fazer um estudo populacional, o que pode ser feito utilizando-se marcadores de microsatélites, após a técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação do DNA e com iniciador heterólogo, desenvolvidos para porco doméstico. O uso desse tipo de iniciador pode diminuir o tempo e as despesas

investidas no isolamento de marcadores microssatélites para cada espécie de interesse tais como, construção de biblioteca genômica, sequenciamento de DNA e determinação de iniciadores (ENGEL *et al.* 1996).

O trabalho consiste na compilação de dados oriundos de publicação e de resultados de Iniciação Científica do Laboratório de Citogenética Animal, com o objetivo de avaliar a diferença ou não das análises populacionais quando comparamos a amostragem total (que consiste em indivíduos onde a análise de todos os locos não foi possível) em detrimento da amostragem baseada em indivíduos onde somente dois ou três iniciadores não foram amplificados.

Para as análises utilizamos três softwares: o software SABIA, programa que determina o tamanho dos fragmentos de DNA para cada loco; o software "GDA", que analisa dados de genética de populações e estima ligação genética, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, distâncias genéticas e também estimadores das estatísticas F e o software "Arlequin", programa de genética de populações capaz de analisar grandes quantidades de amostras de dados moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é ampliar o conhecimento sobre a variabilidade genética em populações de *Tayassu pecari* (queixadas) criadas em cativeiro, utilizando para isso locos de microssatélites, visando otimizar o manejo e a reprodução de espécies silvestres em criadouros.

2.2 Objetivos Específicos

- Compilar os dados de locos de microssatélites obtidos pelo Laboratório de Citogenética Animal para a espécie *Tayassu pecari* e analisar a estrutura populacional e a diversidade alélica entre as populações de queixadas de dois criadouros, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite;
- Determinar os valores de Heterozigose Esperada, Heterozigose Observada e Estatística F;
- Verificar possíveis diferenças nos resultados quando utilizada a amostragem total ou parcial dos dados do Laboratório de Citogenética Animal para a espécie *Tayassu pecari*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ordem Artiodactyla

São também conhecidos como ungulados, e o nome Artiodactyla vem do grego, dedos pares (DÍAZ & BARQUEZ, 2002). A principal característica dos animais desta ordem está relacionada ao plano de simetria das patas, que passa entre o terceiro e o quarto dedo. O primeiro dedo está ausente e o segundo e quinto dedos estão reduzidos em diferentes níveis (NOVAK, 1991). Suas unhas envolvem por completo a extremidade do dedo e somente os dedos dois e três tocam o solo (CABREIRA, 1960, *apud* Reis *et al.* 2006).

Esta ordem divide-se em: Ruminantia (que contém as famílias Antilocapridae, Girafidae, Cervidae, Bovidae, Moschidae e Tragulidae) e Tylopoda (composta por Suidae, Tayassuidae, Hippopotamidae e Camelidae) (REIS *et al.*, 2006). Estão representadas por 81 gêneros e 211 espécies com distribuição em quase todos os lugares do globo terrestre, exceto em áreas do leste da Índia, Nova Guiné e ilhas associadas, Austrália, Nova Zelândia e continente Antártico (NOWAK, 1991, *apud* Reis *et al.* 2006). A ordem inclui 18 famílias extintas (SIMPSON, 1984, *apud* Reis *et al.* 2006).

Possuem muitas áreas glandulares relacionadas com a vida sexual e social. A dentição é altamente especializada, os incisivos superiores e os caninos são reduzidos ou ausentes. Possuem costelas torácicas altas que atuam como ponta da coluna junto às patas anteriores. A maioria das espécies é terrestre, caminhadores e corredores com formas herbívoras e onívoras; o estômago é simples ou composto por três ou quatro câmaras (MONTERO&ALTINO, 2004 *apud* Reis *et al.* 2006).

Como já mencionado, dentro desta Ordem encontra-se a família Tayassuidae e dentro desta família, encontram-se dois gêneros e três espécies (GROVES; GRUBB, 1993): *Tayassu tajacu* (Linnaeus, 1758), *Tayassu pecari* (Link, 1795) e *Catagonus wagneri* (Rusconi, 1930), com distribuição normalmente restrita às Américas (Novo Mundo) sendo que apenas as duas últimas ocorrem no Brasil.

3.2 Família Tayassuidae

Os Taiassuídeos representam um grupo de mamíferos Neotropicais, superficialmente semelhantes aos suídeos do Velho Mundo (SOWLS, 1997 *apud* MANGINI, 1999).

Assim como a família Suidae (suínos), a família Tayassuidae pertence à subordem Suiformes. Ambas as famílias divergiram do seu ancestral comum no início do Oligoceno, cerca de 37 milhões de anos atrás (THEIMER E KEIM, 1998), quando houve a separação dos continentes, originando os tayassuídeos na América do Norte e os suídeos na Eurásia (JÁCOMO, 2004).

Os taiassuídeos são animais robustos, com cabeça curta e triangular, o crânio possui uma crista occipital saliente, o osso pré-nasal em forma de ponta situado sob o nasal. Focinho alongado, móvel e cartilaginoso, com uma superfície terminal sem pelos onde se encontram as narinas (DÍAZ & BARQUEZ, 2002). As patas são finas e curtas, com quatro dedos nos membros anteriores e três nos posteriores. A pelagem é longa e dura, a cauda relativamente curta (comparada à dos suídeos). Os caninos superiores são retos, a mandíbula superior é provida de fossetas para alojar os caninos inferiores, os pré molares e os molares formam uma série contínua de dentes que aumentam em tamanho do primeiro ao último. Seu estômago possui dois compartimentos. São onívoros, habitam florestas e campos, vivem em grandes grupos (MONTERO&ALTINO, 2004, *apud* Reis *et al.* 2006).

3.3 *Tayassu pecari*

O queixada (Figura 2) é o maior e mais agressivo dos porcos selvagens sul-americanos, atingindo 1,10 m de comprimento. Vive do sul do México ao nordeste da Argentina, Equador, Peru, leste da Bolívia, Paraguai até o Atlântico brasileiro (DEUTSCH & PUGLIA, 1990), e em uma grande variedade de habitats, desde regiões de clima árido a florestas tropicais úmidas (seu habitat preferido), especialmente em áreas bem conservadas onde atinge sua grande abundância, pois sua tolerância à áreas desmatadas parece ser mínima, sendo facilmente caçado.

São diurnos, tendendo a ser mais ativos no começo da manhã e no fim da tarde (Mayer & Wetzel 1987 *apud* KEUROGHLIAN *et al.*, 2012). Alimentam-se de

frutos, raízes, talos, fungos, pequenos animais e carcaças, mas sua dieta principal é vegetal (frugívoros), por isso são considerados bons dispersores de sementes. Tem grande capacidade de deslocamento, sendo que um bando pode caminhar 10 km em um dia, gastando dois ou três dias viajando ou forrageando. São fonte de proteína para grandes carnívoros como a onça pintada, com quem possuem estreita relação de ocorrência.

O cariótipo desta espécie possui um $2n=26$ e $NA=46$ (HUFTY, SEDGWICK e BENIRSCHKE, 1973; GIANNONI e FERRARI, 1976a,b,c,d, 1977; BENIRSCHKE e KUMAMOTO, 1989; ROCHA, 1993; VASSART et al., 1994; ANDREA et al., 2001; GUEDES et al., 2002).

Apresenta um comportamento expansivo (em intensidade de exibição), geralmente executado por todos os indivíduos, pela necessidade de marcação territorial e também pela grande agressividade. Quando acuado, bate forte o queixo e é valentíssimo (DUBOST, 1997 *apud* GONELA, 2003).

Vivem em grupos de 15, 40, 100 indivíduos, mas já foram encontrados grupos maiores de 200 indivíduos; ocupam área de uso entre 19 a 200km², (KEUROGHLIAN *et al.*, 2012) e esses grupos são liderados pelos machos mais velhos. Esse modo de vida pode ser uma estratégia de defesa ou um meio para facilitar o encontro de alimentos, mas de qualquer modo, a formação de grandes grupos constitui uma estratégia de sobrevivência pouco usual para um ungulado que habita ambientes florestais. De fato, apenas o *Tayassu pecari* e o *Sus barbatus*, uma espécie de suídeo do sudeste asiático, formam grupos tão numerosos em florestas tropicais (FRAGOSO, 1994 *apud* MANGINI, 1999).

Aparentemente, os grupos de queixadas possuem a proporção aproximada, entre animais adultos, de dois indivíduos de sexo feminino para um de sexo masculino (FRAGOSO, 1994 *apud* MANGINI, 1999). A fêmea tem um período de gestação que dura de 156 a 162 dias, nascendo de um a três filhotes (MAYER e WETZEL, 1987).

Os queixadas, como outras espécies com ampla distribuição geográfica, sofrem diferentes impactos e estão sob diferentes graus de ameaça ao longo de sua distribuição no território brasileiro. Apesar de formarem grupos numerosos e coesos (ou seja, que se mantêm juntos quando se sentem ameaçados), a estrutura social dos queixadas é frágil e depende de ambientes amplos e pouco alterados (MIFSUT, 1990 e SOWLS, 1997 *apud* MANGINI 1999).

Segundo o Instituto Ambiental do Paraná – IAP (MIKICH e BÉRNILS, 2004), as populações naturais de catetos e queixadas estão na lista dos animais ameaçados de extinção no Estado, fato este causado, principalmente, pela devastação dos seus habitats naturais. Desta forma, é provável que as populações destas espécies, devido a essa forte pressão seletiva, tenham reduzido os seus tamanhos efetivos, o que estaria, conseqüentemente, favorecendo o endocruzamento ou a deriva genética (SILVA 2006).

Apesar das legislações proibitivas com relação à caça, a fauna silvestre continua sendo utilizada há décadas como fonte de proteína animal. Os queixadas são um dos exemplos de animais que estiveram durante anos entre as espécies mais exploradas através da atividade de caça na América Latina (Redford & Robinson, 1991), constituindo-se em uma importante fonte de alimento e renda para diversas tribos e populações rurais (MARCH, 1993), além do fato de possuírem carne entre as mais apreciadas e o couro apresentar altos valores de venda e de demanda no mercado internacional (FIGUEIRA, 2003).

Figura 2 - *Tayassu pecari* (queixada)



FONTE: Ives José Sbalqueiro, 2002.

Mesmo estando entre as candidatas ao aproveitamento sustentável, uma das barreiras encontradas é que existe pouca informação sobre o comportamento,

ecologia, habitat e biologia da população. Outro fator é a falta de dados sobre genética populacional.

A espécie necessita de uma vasta área para sobreviver (100 km² para um grupo de aproximadamente 100 animais), e como essas áreas estão cada vez mais fragmentadas, provavelmente ocorram problemas de consangüinidade (FRAGOSO, 1998).

Em meio selvagem, os queixadas, têm alto fluxo gênico entre suas populações, devido aos grandes deslocamentos. Há estudos que apontaram populações de queixadas que são geneticamente semelhantes em localidades com até 80 km de distância no Pantanal, o que mostra que a espécie realmente necessita de grandes áreas conectadas para evitar a deriva genética e a endogamia. (KEUROGHLIAN *et al.*, 2012).

3.4 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são muito utilizados para estudos de genética e melhoramento, pois apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos, que eram aplicados até a década de 60.

Podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los:

- identificados por hibridização: marcadores RFLP e minissatélites ou locos VNTR.
- revelados por amplificação: marcadores do tipo RAPD, microsatélites (os quais serão utilizados neste trabalho) e AFLP.

Após obter uma quantidade adequada de marcadores genéticos para uma determinada espécie pode-se estimar aspectos da estrutura populacional tais como subdivisões de populações, dispersão, fluxo gênico, tamanho populacional efetivo, estratégia de melhoramento e história evolutiva (ENGEL *et al.*, 1996; ROED, 1998 *apud* GONELA, 2003).

Conforme GONELA(2003), as análises de DNA em estudos de populações têm várias vantagens significativas: (1) o genótipo é analisado diretamente; (2) uma ou mais sequências apropriadas a uma questão específica podem ser selecionadas; (3) muitos métodos são gerais para algum tipo de DNA; (4) o DNA pode ser extraído

de pequenas quantidades de tecido e é relativamente estável.

3.5 Microssatélites

São trechos curtos, de sequências simples, que ocorrem como elementos altamente repetitivos em *tandem* em todos os genomas eucariotos (TAUTZ, 1989). Estas sequências, também conhecidas como SSR (“Simple Sequence Repeats”), apresentam repetições das unidades nos diferentes locos que variam de um a cinco nucleotídeos em tamanho. Na maioria das vezes essas sequências são dinucleotídicas, sendo que o número de vezes que essas pequenas unidades se repetem varia de indivíduo para indivíduo e resulta no polimorfismo (AZEVEDO, 2008).

Devido à grande variabilidade no número de repetições da maioria dos locos, os microssatélites são amplamente usados em aplicações forenses, estudos genéticos de populações, mapeamento genético e físico de genomas e, conseqüentemente, têm se tornado o suporte principal de análises genômicas em diferentes organismos (RUBINSZTEIN *et al.*, 1995).

Estes locos, amplificados via PCR, constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis hoje, podendo ser rapidamente isolados em bibliotecas genômicas. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites distribuem-se preferencialmente nas regiões não codificadoras do DNA, e por isso não sofrem ação da seleção natural, o que os torna um marcador seletivamente neutro muito útil para estudos da genética de populações naturais (GONELA, 2003).

Com este enfoque, SILVA (2006), utilizou seis pares de oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *Sus scrofa scrofa* - porco doméstico - (SW857, SW1407, SW1408, SW2411, ACTG2 e SW444) em uma amostra de 25 queixadas (16 machos e 9 fêmeas), originários do Estado do Paraná, e mostrou que cinco dos *loci* eram polialélicos, variando de 4 a 16 alelos em catetos e 3 a 10 em queixadas. Mesmo assim, a diversidade genética foi considerada baixa devido ao excesso de homozigotos nos mesmos. Os valores de F_{st} (0,042, em catetos, e 0,138, em queixadas) mostraram que as populações não estão estruturadas, ou seja, não há fluxo gênico. Com estes resultados verificamos que a

utilização de iniciadores heterólogos é viável e importante, pois minimiza tempo e custo.

Em seu trabalho com queixadas, GONELA (2003), não encontrou diferenças significativas entre as heterozigosidades observada e esperada em nenhum dos locos estudados. Para esses mesmos locos o autor estimou a freqüência de alelos nulos e encontrou valores negativos, próximos de zero, para ambos os locos, atribuindo tais achados ao excesso de heterozigotos na população.

Portanto, pode-se perceber que a utilização dos microssatélites tem aumentado significativamente em estudos sobre comparações da variabilidade genética entre espécies e populações, história evolutiva e estrutura populacional (ENGEL *et al.*, 1996).

3.6 Estudos com Marcadores Moleculares em Tayassuidae

Mesmo não sendo desenvolvidos iniciadores espécie-específicos para as análises de microssatélites em queixadas, pode-se usar os iniciadores desenvolvidos para espécies próximas. A amplificação utilizando locos de microssatélites do porco doméstico está respondendo de forma satisfatória em taiassuídeos (GONELA, 2003).

LOWDEN *et al.* (2002) utilizaram 31 iniciadores de microssatélites de porco doméstico em sete espécies de porcos selvagens, dentre elas, *T. tajacu*, na qual sete iniciadores amplificaram e o número de alelos variou de um a três.

GONGORA *et al.* (2002) avaliaram a amplificação interespecífica de marcadores microssatélites utilizando iniciadores de porco doméstico em *T. tajacu*. Dezoito iniciadores foram testados em seis indivíduos de *T. tajacu*, sendo que dezesseis amplificaram com sucesso. Isso sugere, relativamente, baixo nível de divergência nucleotídica entre estas linhagens.

GONGORA & MORAN (2005) trabalharam num estudo visando à compreensão da filogenia da família Tayassuidae. Através da análise de sequências de DNA nuclear e mitocondrial, revelou-se que *Catagonus wagneri* e *Tayassu pecari* estão mais relacionados entre si do que com *Tayassu tajacu*, sustentando a proposta de que a espécie *Tayassu tajacu* comporta um outro gênero dentro da família, o *Pecari tajacu*.

TELLES *et al.* (2003) avaliaram o padrão de amplificação de marcadores RAPD em bandos de queixada do Parque Nacional das Emas. Foram amplificados com sucesso, 30 dos 40 iniciadores testados, a partir do DNA de 18 indivíduos de dois bandos, fornecendo um total de 203 locos, com uma média de sete locos por iniciador. Considerando os dois bandos analisados, cerca de 72% dos locos mostraram-se polimórficos.

GONELA (2003) trabalhou com seis locos microssatélites de porco doméstico em queixada (*T. pecari*) e porco monteiro (*Sus scrofa* sp). Concluiu que iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* podem ser utilizados com sucesso em *Tayassu pecari*, sendo altamente informativos e podendo ser úteis nas análises populacionais e estudos filogenéticos. Entre os seis locos analisados, quatro foram polimórficos. Porém, quando se trabalha com iniciadores heterólogos é de se esperar que haja uma redução no número de alelos observados. O mesmo autor estimou as frequências alélicas dos mesmos seis locos microssatélites em *Sus scrofa* sp. e *Tayassu pecari*, observando uma considerável variação na distribuição dessas frequências entre os locos microssatélites. A distribuição em cada espécie foi significativamente diferente, em quatro locos os alelos observados foram típicos para cada espécie, ou seja, eles identificaram claramente as duas espécies.

SILVA (2006) utilizou marcadores microssatélites desenvolvidos para porco doméstico para amplificar em catetos e queixadas. Houve amplificação dos seis locos utilizados, sendo cinco locos polimórficos e um monomórfico para ambas as espécies. Foram encontrados 52 alelos em catetos e 30 alelos nos queixadas. Com o valor de Fis encontrado (0,54 e 0,35 para catetos e queixadas, respectivamente), sugere-se que há um alto nível de endocruzamento, que explica o excesso de homozigotos observado nas duas populações. Através do cálculo de Fst, percebe-se que as populações de catetos (Fst=0,04) e queixadas (Fst=0,13) não estão estruturadas, ou seja, a variabilidade encontrada está dentro e não entre as populações. Já quando comparadas as duas espécies, percebeu-se a estruturação, ou seja, não há fluxo gênico entre as espécies.

CARVALHO (2012) também trabalhou com a análise da variabilidade genética utilizando marcador microssatélite heterólogo. Dos três iniciadores analisados em amostras de *Tayassu tajacu*, dois tiveram sucesso de amplificação. Tal resultado também demonstra a possibilidade de utilização dos marcadores heterólogos. CARVALHO encontrou os valores de Heterozigosidade Observada

($H_o=0,25$) menor do que a Esperada ($H_e=0,66$), e o Fis encontrado ($Fis=0,57$) indicou excesso de homozigotos, corroborando com os resultados encontrados por SILVA (2006). Entretanto o número de alelos encontrados evidenciou a existência de variabilidade genética nessas populações, mostrando que o problema não estava na falta de alelos e sim no excesso de cruzamentos endogâmicos.

JESUS (2012), ao trabalhar com queixadas, também obteve Heterozigosidade Observada ($H_o=0,20$) menor do que a Esperada ($H_e=0,54$), e com relação à estatística F obteve $Fst=0,16$, considerado um indicativo de diferenciação significativa entre as populações dos cativeiros; e Fis (coeficiente de endocruzamento) igual a 0,64, um alto valor nessas sub-populações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Este trabalho contou com 25 amostras de queixadas (16 machos e 9 fêmeas), provenientes de dois criadouros do Estado do Paraná: Parque Municipal das Araucárias no Município de Guarapuava (PMA-G) e Fazenda Experimental Gralha Azul, no Município de Fazenda Rio Grande (FEGA-FRG) (Tabela 1). As amostras estão armazenadas no Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Foram coletadas entre julho de 2002 a outubro de 2004. As análises dos microssatélites são provenientes de estudos anteriores: dissertação de SILVA (2006) (iniciadores SW1408, SW2411 e ACTG2) e artigo (2010), e monografia de JESUS (2012) (SWR1928) e trabalhos de iniciação científica de KALB (2008) (IGF-1), BONETTI (2011) (CGA), CARVALHO (2010) (TNFB) e VATTE (2013) (SW1407, SW857, ALOX12A, e SW444).

Tabela 1 - Espécies, número de indivíduos, sexo e localidades das amostras de queixadas

ESPÉCIE	MACHOS	FÊMEAS	TOTAL	LOCALIDADE DA COLETA
<i>Tayassu pecari</i>	11	3	14	Guarapuava/PR
	5	6	11	Fazenda Rio Grande/PR

De cada animal foi coletado aproximadamente 3 mL de sangue periférico em seringa esterilizada contendo o anticoagulante EDTA, que é o mais indicado para estudos moleculares. Após a coleta, o sangue ficou armazenado a -20°C em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL.

Parte dos dados aqui analisados foi obtida por mim junto ao trabalho de CARVALHO (2010).

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada pelo método “*salting out*”, segundo o protocolo descrito por MEDRANO, AESEN e SHARROW (1990), com modificações (SILVA, 2006), que consistiu em:

- Colocar 300 a 400 μL de sangue em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Adicionar 800 μL de STE (NaCl 5M, Tris 1M; EDTA 0,5M) e centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm.
- Descartar o sobrenadante, adicionar 800 μL de STE com 11 μL de TRITON e centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm.
- Descartar o sobrenadante, adicionar 500 μL de STE e centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm.
- Retirar bem o STE e adicionar na sequência: 550 μL solução de lise (NaCl 100mM, Tris 50mM, EDTA 50mM, pH=8,0), 27,5 μL de SDS 20%, 2,5 μL de β -mercaptofenol 2%, 11 μL de proteinase K e agitar. (Observação: o β -mercaptofenol 2% e a proteinase K devem ser adicionados na capela).
- Colocar em banho-maria a 55°C por 2 horas, adicionando-se 5,5 μL de RNase-A uma hora antes de tirar os tubos do banho-maria.
- Retirar do banho-maria, adicionar 600 μL de NaCl a 5M e passar no agitador por 20 segundos.
- Centrifugar por 30 minutos a 13000 rpm e transferir o sobrenadante para três tubos de microcentrífuga de 1,5 mL deixando 390 μL do material em cada tubo.
- Adicionar 700 μL de etanol absoluto e gelado (-20°C) em cada tubo (virar o ependorf para baixo e para cima para ver o DNA se formando) e deixar “overnight”, em geladeira a 4°C.
- Centrifugar por 30 minutos a 13000 rpm.
- Descartar o sobrenadante e lavar o DNA com 700 μL de etanol a 70%.
- Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm, descartando o sobrenadante.
- Repetir as duas etapas anteriores até retirar bem os sais.
- Descartar o sobrenadante e inverter o tubo aberto em papel absorvente para retirar todo o etanol.
- Colocar os tubos abertos em estufa a 37°C por 30 minutos.

- Adicionar 30 μL de TE (Tris 10mM e EDTA 1 mM, pH=8,0) e deixar em banho-maria a 37°C por 30 minutos para que o DNA fique em suspensão.
- Juntar a suspensão de DNA em um único tubo de microcentrífuga e estocar no freezer (a -20°C).

4.3 Qualificação, Quantificação e Diluição do DNA Extraído

A qualificação das moléculas do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,5M), por 30 minutos a 100V, com aplicação de 4 μL de DNA total com 1 μL de azul de bromofenol 1,5%. A detecção de bandas de alto peso molecular, consideradas amostras com DNA íntegro, foi evidenciada através de coloração com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{l/ml}$ em água destilada durante 15 minutos (solução estoque 10 $\mu\text{l/ml}$) e visualizadas sob luz UV.

Para quantificar o DNA utilizou-se o *NanoDrop*. Este aparelho quantifica o DNA de acordo com a lei de *Lambert-Beer*.

$$C = \text{Abs.} \cdot e / b$$

Onde:

C = concentração do DNA em ng/ μL ;

Abs = absorvância;

e = coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50ng.cm/ μL);

b = altura da coluna criada no espectrofotômetro (neste caso, corresponde a 1cm).

Assim, quando o *NanoDrop* mede a absorvância a 260nm obtém-se um valor, que multiplicando por 50 (constante **e**) indica a concentração do DNA na amostra em ng/ μL .

As amostras com concentração de DNA acima de 20ng/ μL foram diluídas em água Mili-Q autoclavada a fim de se obter um padrão de amostras de DNA de trabalho.

Para as diluições, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Onde:

C_i = concentração do DNA que se quer diluir (resultado do *NanoDrop*);

V_i = volume procurado;

C_f = é a concentração de uso = 20ng/ μ L;

V_f = 100 μ L.

Ao encontrar o volume de DNA (V_i), adiciona-se água mili-Q até completar 100 μ L. As amostras foram então estocadas em tubos de microcentrífuga de 0,6 mL e armazenadas a -20°C, até o momento da amplificação.

4.4 Amplificação dos Locos Microssatélites

No Laboratório de Citogenética Animal contamos com 14 pares de oligonucleotídeos iniciadores, todos desenvolvidos para porco doméstico. Até o momento foram utilizados 11 iniciadores para analisar e caracterizar o DNA das amostras de queixadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores, localização cromossômica na espécie de *Sus scrofa domestica*

Loco	Sequência do Iniciador	Cromossomo
SW1408 (dinucleotídeo)	5'CAGCCCTGTCACCTTGAGTAGC3' 5'TTCTGCTCTACAGCAAAGCG3'	2
SWR1928 (dinucleotídeo)	5' TAGGGTCAGTGCATCCTTCC3' 5' ACGAGAACTCCGAACCCTG3'	7
SW1407 (dinucleotídeo)	5'AGCCACTAGGGAACTTCAAATG3' 5'CCCACTTTTTCTCTCAAGCTG3'	13
SW857 (dinucleotídeo)	5'TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC3' 5'GATCCTCCTCCAAATCCCAT63'	14
SW2411 (dinucleotídeo)	5'CCTGGACTCATTCTTGCTTTG3' 5'TTCCTATTCTGTCCTGCCTTG3'	16
ACTG2 (dinucleotídeo)	5'CATCTTCCTCTTCCCTTCCC3' 5'TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC3'	3
ALOX12A (mononucleotídeo)	5'CTTCAATGGTGCAGTGGGTTG3' 5'ACTTTAATCAGATACAGAAGTTGG3'	12
CGA (dinucleotídeo)	5'GTCACAGTGGATGGCATTG3' 5'ACATCCCTAAGGTCGTGGC3'	1
IGF-1 (dinucleotídeo)	5'GCTTGGATGGACCATGTTG3' 5'CACTTGAGGGGCAAATGATT3'	5

SW444 (dinucleotídeo)	5'ATAGTTTTCGGTTGGCCCAG3' 5'CTTAAGCCTCAAGCTAACAGGC3'	8
TNFB (dinucleotídeo)	5'CTGGTCAGCCACCAAGATTT3' 5'GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC3'	7

Os iniciadores SW1408, SW1407, SW857, SW2411 e SWR1928 foram escolhidos através de comparações de bandas G – regiões homeólogas – entre *Sus scrofa scrofa* (javali), *Tayassu tajacu* e *Tayassu pecari*. Por ser uma subespécie do porco doméstico, o javali possui o cariótipo muito semelhante ao do suíno doméstico permitindo, portanto, este tipo de comparação. Com este tipo de escolha, aumentam-se as chances de amplificação positiva nas espécies de queixada e também de cateto. Os demais iniciadores ACTG2, ALOX12A, CGA, IGF-1, SW444 e TNFB tiveram por base os iniciadores utilizados por GONELA (2003).

Os locos selecionados foram amplificados por PCR em termociclador, e vários testes foram feitos, tanto nas condições de temperatura quanto nas concentrações dos reagentes, baseadas nos dados de GONELA (2003) e SILVA (2006; 2010).

A reação para a amplificação (chamada mix) foi feita em um volume final de 15 µL utilizando Iniciadores (*primers*), Tampão Sulfato (670mM Tris-HCl pH=8,8; 160mM (NH₄)₂SO₄), Cloreto de Magnésio (MgCl₂), dNTPs, *Taq* DNA Polimerase e a H₂O mili-Q (Tabela 3). Foram adicionadas as amostras do DNA dos queixadas para a amplificação. Como controle positivo utilizou-se amostras do DNA do porco (*Sus scrofa domestica*). Para maior confiabilidade do trabalho foi feito também o controle negativo, onde somente o mix foi submetido ao termociclador, para ter certeza de que não haveria outro DNA amplificando e interferindo no experimento.

4.5 Visualização dos Produtos de Amplificação

A visualização dos produtos de amplificação foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida (não desnaturante) 10% (10 mL de solução de acrilamida 30%, 2,1mL de glicerol, 14,57 mL água destilada, 3,0 mL TBE 10X, 40µL de APS (10%) e 400 µL de TEMED). O gel é preparado e colocado entre duas placas de vidro (de 23cm X 25cm) e presos por grampos, onde é polimerizado formando poços (com a ajuda de um pente específico). As placas contendo o gel são fixadas numa

cuba vertical contendo tampão TBE 1X. Em cada poço foi aplicado 5µL do produto de PCR juntamente com 4µL de corante azul de bromofenol (para gel não desnaturante 6%). Foi utilizado o marcador de peso molecular (*ladder*) de 25 pb (Invitrogen), que também é adicionado com o corante numa proporção de 0,5 µL do ladder para 4,0µL de corante e aplicado no gel. A eletroforese foi realizada em diferentes condições de voltagem (entre 150 a 200V), amperagem (em média 10mA) e duração (aproximadamente 5 horas).

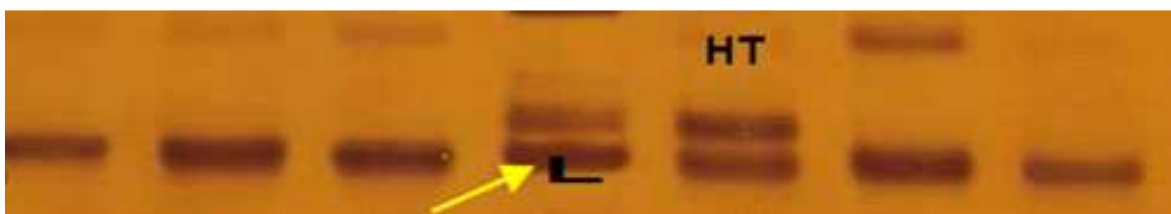
Terminada a eletroforese, o gel (Figuras 3 e 4) foi fixado seguindo o protocolo descrito por TEGELSTROM (1992), em que o gel é colocado em solução fixadora de etanol 10% e ácido acético 0,5% por 3 minutos e, em seguida, impregnado em solução de nitrato de prata 0,2%. Após esta etapa, é então colocado em solução reveladora de hidróxido de sódio 2,75% e formaldeído 1% até o aparecimento das bandas, e então é novamente colocado em solução fixadora por 5 minutos.

Figura 3 – Exemplo de gel de poliacrilamida.



Loco ALOX12A (P: amostra do porco; L: ladder de 25 pb; B: branco, controle negativo; a setas indicam indivíduos homocigotos) .

Figura 4 – Exemplo de gel de poliacrilamida.



Loco SW444 (L: ladder de 25 pb; HT: indivíduo heterocigoto).

Após este processo, o gel foi conservado entre folhas de papel celofane para posterior digitalização. Assim pode-se analisar e determinar a tipagem dos locos de microssatélites.

4.6 Análises dos Dados

Obtendo o padrão de bandas para cada loco de microssatélites, foram calculados os índices de diversidade em cada população estudada. O tamanho dos alelos foi determinado pela comparação com marcador de peso molecular (Ladder) de 25 pb (Invitrogen), através do software SABIA, que é disponibilizado livremente (SOARES *et al*, 2010).

A Heterozigose é uma medida da variabilidade genética das populações e é calculada de acordo com o Esperado (H_e) e o Observado (H_o) para cada loco, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número de alelos por loco, a H_o e a H_e foram calculados através do programa GDA - Genetic Data Analysis (LEWIS e ZAYKIN, 2001). Este software também avalia os efeitos do endocruzamento sobre os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, determinando o valor de Fis (WRIGHT, 1951).

Para determinar a diferenciação entre as populações, conforme SILVA (2006) foi usada a estatística F (WRIGHT, 1951) através da estimativa F_{st} (WEIR & COCKERHAM, 1984), utilizando o Programa ARLEQUIN 2.1 (SCHNEIDER *et al*, 2000). A análise dos valores de F_{st} foi feita considerando-se a classificação de NEI (1978) *apud* GIACOMONI (2002) onde: valores de F_{st} menores que 0,05 são considerados baixos, entre 0,05 e 0,15 são médios e maiores que 0,15 são considerados altos, indicando estruturação populacional baixa, média e alta, respectivamente.

Estas análises foram efetuadas com os dados amostrais totais, considerando os indivíduos onde houve falhas em amplificação de vários loci em comparação com a análise de dados parciais onde indivíduos que apresentaram falha de amplificação em mais de quatro loci foram desconsiderados (Anexo – indivíduos em destaque foram removidos da análise de dados parciais).

5 RESULTADOS

Foram realizados vários testes com diferentes concentrações de cloreto de magnésio e de DNA, e com diferentes temperaturas de anelamento para os 11 iniciadores aqui testados (tabela 3).

Tabela 3 - Concentração de Cloreto de Magnésio e DNA nos 11 iniciadores.

LOCO	Concentração de MgCl₂ (mM)	Concentração de DNA (ng/ µL)	Temperatura de hibridação (°C)
SW1408	3,0	100	62-54
SWR1928	3,0	50	58
SW1407	1,5	50	58
SW857	1,5	60	58
SW2411	3,0	50	58
ACTG2	2,0	50	62-54
ALOX12A	3,0	20	58
CGA	?	?	?
IFG-1	1,5	100	62-54
SW444	2,0	100	62-54
TNFB	3,0	50	56-48

O tamanho dos alelos determinado pelo software SABIA está descrito na tabela 4:

Tabela 4 - Tamanho dos fragmentos e número de alelos amplificados em *Tayassu pecari*

LOCO	Tamanho dos fragmentos (pb)	Número de alelos
SW1408	130-138	4
SWR1928	136-148	6
SW1407	112-120	3
SW857	130-140	4

SW2411	186-228	10
ACTG2	118-134	7
ALOX12A	133-146	9
CGA	140-148	4
IFG-1	241-245	2
SW444	92-122	5
TNFB	174-228	5

5.1 Análise dos Dados

As análises da Heterozigosidade Esperada e Heterozigosidade Observada foram geradas para um total de 11 locos de microssatélites, pois foram incluídos nesse estudo os resultados de trabalhos anteriores.

Nem todos os indivíduos mostraram sucesso na amplificação para todos os locos, alguns demonstraram problemas já na extração, e alguns durante a PCR. Devido a isso, para efeito de comparação, foram geradas duas tabelas para a Heterozigosidade Esperada e Observada: uma em que encontramos todas as amostras, mesmo as que não resultaram em um padrão de bandas no gel de poliacrilamida, e outra em que foram retirados os indivíduos que não amplificaram mais de quatro loci (SW1928, SW1907, SW857 e ALOX12A) (tabela 5 e 6 respectivamente).

Tabela 5 - Valores de heterozigosidade esperada e observada nas duas populações, para todos os indivíduos

LOCOS	Nº (amostra)	He	Ho
SW1408	25	0,60	0,32
SWR1928	18	0,81	0
SW1407	18	0,52	0,22
SW857	18	0,69	0,05
SW2411	25	0,87	0,52
ACTG2	25	0,54	0,56
ALOX12A	17	0,89	0

CGA	17	0,66	0,05
IFG-1	19	0,10	0
SW444	17	0,67	0,05
TNFB	20	0,75	0
Total/Média	19,9	0,64	0,16

Tabela 6 - Valores de heterozigosidade esperada e observada nas duas populações, indivíduos que amplificaram a maioria dos iniciadores

LOCOS	Nº (amostra)	He	Ho
SW1408	17	0,64	0,47
SWR1928	17	0,81	0
SW1407	17	0,50	0,23
SW857	17	0,70	0,05
SW2411	17	0,90	0,64
ACTG2	17	0,60	0,64
ALOX12A	16	0,89	0
CGA	16	0,63	0,06
IFG-1	17	0,11	0
SW444	16	0,67	0,06
TNFB	17	0,74	0
Total/Média	16,7	0,65	0,19

Comparando-se as duas tabelas geradas, percebe-se pouca diferença nos valores de Heterozigosidade Esperada e Observada, o que demonstra que mesmo não obtendo resultado de amplificação para alguns indivíduos, este fato aparentemente interfere pouco nos resultados encontrados.

Sendo assim, considerando o total de 25 indivíduos, os valores encontrados foram $He=0,64$ e $Ho=0,16$, evidenciando que o número de indivíduos homozigotos encontrado foi muito elevado. Somente no loco ACTG2 foi observado um He menor que o Ho.

Com relação ao tamanho dos alelos, foram encontrados 59 alelos, que variam entre 92pb (SW444) a 228pb (SW2411), sendo que os alelos exclusivos de

cada população estão descritos a seguir (Tabela 7). O tamanho dos fragmentos encontrado para cada um dos alelos está em anexo (ANEXO)

Tabela 7 - Alelos específicos de uma população

LOCOS	PMA	FEGA
SW1408	136	-
SWR1928	136 140	142 148
SW1407	-	120
SW857	132	-
SW2411	186 196 212 220 222 228	-
ACTG2	120 124 132 134	118 122
ALOX12A	133 136 138 140 142 146	137 139 141
CGA	144	140
IFG-1	241	-
SW444	92 96 98	122
TNFB	180 228	226
Total	27	11

Em ambas as populações foram encontrados alelos específicos em machos, por exemplo: na população PMA-G, o indivíduo Que07, possui os alelos 136 (SWR1928), 138 (ALOX12A) e 98 (SW444), e o indivíduo Que15 possui os alelos 140 (SW1928), 136 (ALOX12A), 144 (CGA) e 180 (TNFB). Já na população FEGA-FRG, o indivíduo Que21 possui 148 (SW1928), 139 (ALOX12A) e 122 (SW444), e o indivíduo Que28 possui 142 (SW1928), 140 (CGA) e 122 (SW444). Estes machos poderiam ser indicados para serem trocados entre cativeiros com o intuito de disseminar variantes alélicas nas duas populações.

As análises de Estatística F também foram feitas utilizando os dados de locos de trabalhos anteriores. O valor de Fst determina a diferenciação entre as subpopulações, e nos trabalhos anteriores variou de 0,64 a 0,66.

O Fis, efeito do endocruzamento sobre os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi calculado com o software GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001) e foi de 0,21.

Com relação ao polimorfismo genético, os resultados, calculados também com o programa GDA, nos permitem fazer uma comparação interessante: Quando

se faz a análise das duas populações separadamente, obtém-se o resultado constante na Tabela 8:

Tabela 8 - : Polimorfismo genético encontrado em cada população

População	n	P	A	Ap
PMA	11,6	1.0	4,45	4,45
FEGA	8,2	0,9	3,0	3,2
Total/Média	9,9	0,95	3,72	3,8

(Nota: n= número de indivíduos; P = proporção de alelos polimórficos; A = número médio de alelo por loco; Ap = número médio de alelos por loco polimórfico.)

Já quando se faz uma análise para cada loco, o resultado obtido é o que segue na Tabela 9:

Tabela 9 - Polimorfismo genético encontrado em cada loco

LOCOS	n	P	A	Ap
SW1408	25	1.0	4.0	4.0
SWR1928	18	1.0	6.0	6.0
SW1407	18	1.0	3.0	3.0
SW857	18	1.0	4.0	4.0
SW2411	25	1.0	10.0	10.0
ACTG2	25	1.0	7.0	7.0
ALOX12A	17	1.0	9.0	9.0
CGA	17	1.0	5.0	5.0
IFG-1	19	1.0	2.0	2.0
SW444	17	1.0	5.0	5.0
TNFB	20	1.0	6.0	6.0
Total/Média	19,9	1.0	5,54	5,54

(Nota: n= número de indivíduos; P = proporção de alelos polimórficos; A = número médio de alelo por loco; Ap = número médio de alelos por loco polimórfico.)

6 DISCUSSÃO

Como relatado na literatura os microssatélites são marcadores conservados na classe dos mamíferos, principalmente entre espécies mais relacionadas evolutivamente, por isso ocorre a amplificação heteróloga do iniciador de porco doméstico em queixadas (MOORE *et al.*, 1991, *apud* GONELA, 2003). O tempo estimado que separa os suínos dos taiassuídeos (37 milhões de anos), é considerado um tempo satisfatório para obter ao menos 50% de amplificação heteróloga. Esse método de amplificação heteróloga é utilizado visando diminuir gastos e tempo com pesquisas para desenvolvimento de iniciadores específicos. No entanto, quando se trabalha com marcadores heterólogos é de se esperar que haja uma redução no número de alelos observados na população estudada (GONELA, 2003).

Em comparação com o controle positivo, houve uma pequena redução no tamanho dos fragmentos analisados, fato que também foi relatado por GONELA (2003).

Quando observadas as análises da amostra total e parcial estas apresentam pouca diferença, provavelmente pelo fato de que as amostras de cada cativeiro já serem amostras pequenas. Estes valores poderiam ser diferentes caso as populações analisadas fossem compostas por mais indivíduos. Assim, sugerimos que em caso de dados escassos todos devem ser utilizados visando à análise de uma maior abrangência de informações

Os resultados do presente trabalho mostram que a heterozigosidade observada foi bem menor que a esperada em ambos os criadouros. GONELA (2003), não encontrou diferença significativa entre a heterozigosidade esperada e a observada em seu trabalho, estudando indivíduos livres. Porém nossos dados corroboram com SILVA, 2006. Os fatores que possibilitam tal resultado são vários.

Primeiramente, as fêmeas de queixadas possuem o comportamento de cruzar com um macho alfa. Em habitat natural, esses animais vivem em grandes grupos, onde há uma disputa entre os machos para ser o macho alfa do bando, ou seja, há sempre troca do provedor de genes. Porém, como este trabalho trata de populações de cativeiro, há uma limitação no número de indivíduos, reduzindo a

possibilidade de troca do provedor genético. Ainda assim, observando os alelos dos machos de ambas as populações, podemos inferir que, em cativeiro a ocorrência de um macho alfa não é claramente evidenciada.

O efeito fundador também influencia na mudança da composição genética desta população, uma vez que ela é originada a partir de um número pequeno de indivíduos. Isso resulta no aumento de cruzamentos endogâmicos.

É importante lembrar que as populações naturais de queixadas estão na lista de animais ameaçados de extinção no Estado do Paraná, segundo o IAP – Instituto Ambiental do Paraná, portanto, é provável que as populações desta espécie tenham reduzido os seus tamanhos efetivos, o que consequentemente estaria favorecendo o endocruzamento ou a deriva genética (SILVA, 2006).

Outro fator que pode estar relacionado à elevada homozigose é a presença de alelos nulos, que pode ocorrer devido a uma mutação em uma posição do iniciador ou pela deleção de um microsatélite inteiro. Utilizando marcadores heterólogos aumentam as chances de ocorrer alelos nulos, e em heterozigose os heterozigotos vão aparecer como homozigotos, implicando em excesso deles na população (GONELA, 2003).

Os valores de diferenciação entre as populações (F_{st}) são assim classificados: menores que 0,05 são considerados baixos, entre 0,05 e 0,15 são médios e maiores que 0,15 são considerados significativos ou altos, indicando estruturação populacional baixa, média e alta, respectivamente (WRIGHT, 1951). Os fragmentos populacionais podem variar estruturalmente em cativeiros, a baixa estruturação populacional pode ocorrer quando animais de regiões próximas fundam populações separadas e estas populações não estão separadas tempo suficiente para se diferenciarem. Com altas taxas de fluxo gênico entre os fragmentos a diferenciação é pequena, e o F_{st} baixo. Nos trabalhos anteriores, o F_{st} variou de 0,64 a 0,66, sendo considerado um indicativo de diferenciação significativa entre as populações, ou seja, pode-se dizer que cada população de cativeiro foi formada por fundadores de populações distantes uma da outra, pois se fossem fundadores de populações próximas, haveria pouco tempo para uma estruturação populacional. Esses dados confirmam os da tabela 7 que indica uma diferenciação entre os cativeiros, sendo importante para programas de manejo, visando à troca de indivíduos do sexo masculino.

Esse resultado difere do trabalho de SILVA (2006), onde o valor de F_{st} foi baixo, revelando ausência de estruturação entre as populações de queixada.

Ainda nesse estudo foi determinado pelas análises estatísticas que o coeficiente de endocruzamento F_{is} foi elevado (0,21) o que também foi encontrado em SILVA (2006) ($F_{is} = 0,47$). Assim, a alta taxa de endocruzamento também resulta no alto número de homozigotos.

Este estudo, assim como os demais analisados, evidencia a variabilidade genética, encontrando vários alelos diferentes nas populações, certificando que o problema não está na falta de alelos e sim no excesso do cruzamento endogâmico.

Entre os cativeiros que possuem altas taxas de homozigotos, é importante determinar machos que se diferenciam para promover possíveis permutas entre as sub-populações. Isso pode ser feito, por exemplo, trocando-se os indivíduos Que07 ou Que15, do criadouro PMA-G com os indivíduos Que21 ou Que28 de FEGA-FRG, pois esses indivíduos podem ajudar a disseminar os alelos nas outras populações.

Os resultados encontrados com relação ao polimorfismo permitem concluir que apenas a população PMA se apresenta polimórfica. Porém, quando consideramos todos os locos, o resultado é o descrito na Tabela 9, onde todos os locos são polimórficos. Isso se deve ao fato de que, ao analisarmos o iniciador IGF-1, apenas um único indivíduo apresenta o alelo 241 (em homozigose). Como este indivíduo pertence ao criadouro PMA, este loco se torna polimórfico nesta população. Já na população FEGA, todos os indivíduos possuem o alelo 245, e por isso ela é considerada monomórfica para este loco. Ao considerarmos todos os 19 indivíduos como uma única população, um único apresenta o alelo 241, tornando o loco polimórfico.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho nos permitiu concluir que a utilização de marcadores heterólogos é eficiente, apesar da dificuldade encontrada para a padronização das condições de amplificação, confirmando os dados da literatura, o que torna os marcadores heterólogos muito úteis em análises populacionais;

Todos os iniciadores testados tiveram sucesso de amplificação, sendo que todos foram polimórficos.

A análise dos dados populacionais totais e parciais apresentou pouca diferença, provavelmente por se tratar de uma amostra já limitada.

A taxa de indivíduos homocigotos encontrada em ambas as populações foi muito elevada, fato que decorre provavelmente devido à alta taxa de endocruzamento ($F_{is} = 0,21$).

O grande número de alelos encontrado demonstra que há diversidade genética dentro das populações, concluindo que o problema não está na falta de alelos e sim na alta taxa de endocruzamento.

Nota-se através do cálculo de F_{st} (0,64 a 0,66) que há diferenciação entre as populações de FEGA-FRG e PMA-G.

É importante estabelecer medidas de manejo nos criadouros, como por exemplo, a troca de indivíduos (troca gamética), para permitir a entrada de novos alelos nas sub-populações e evitar a perda da variabilidade genética.

Verifica-se a necessidade de continuidade do estudo, uma vez que são poucos os trabalhos relacionados a marcadores moleculares em taiassuídeos.

REFERÊNCIAS

- Armazem da SeFloral.** Disponível em <<http://www.sefloral.com.br/mamiferos13.htm>>. Último acesso em 20/03/2012.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de Microrganismos.** 2ª Ed. Editora UFG, Goiânia, 2008, 536 p.
- BANHOS, A. - Genética, **Distribuição e Conservação do gavião-real (*Harpia harpyja*) no Brasil.** Manaus, 2009. 47p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.
- BIONDO, C. *et al.* **Análises Moleculares para Monitoramento Genético de Queixadas (*Tayassu pecari*) e Catetos (*Pecari tajacu*) Isolados em um Fragmento Florestal.** Sociedade de Ecologia do Brasil. Disponível em <<http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/857.pdf>>. Último acesso em 03/10/2012.
- BODMER, R.E.; SOWLS, L.K. 1993. **The Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan.** Disponível em <<http://www.iucn.org/search.cfm?uSearchTerm=suiformes>> Último acesso em 21 março 2012.
- BONETTI, G. E. **Avaliação da Variabilidade Genética em *Tayassu pecari* (Queixada) Através de Marcadores Microsatélites.** 18 p. Relatório de Iniciação Científica. Departamento de Genética – Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.
- CARVALHO, A. **Avaliação da Variabilidade Genética em *Tayassu tajacu* (cateto) Através de Marcadores Microsatélites.** Curitiba 2011. Monografia. Universidade Federal Do Paraná.
- DEUTSCH, L.A.; PUGLIA, L.R. **Os animais silvestres – Proteção, doenças e manejo.** São Paulo: Globo, 2ª ed., 191p., 1990.
- DÍAZ, M.M; BARQUEZ, R.M. **Los Mamíferos de Jujuy Argentina.** Editora L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina, 2002, 326 p.
- ENGEL, S.R. *et al.* Conservation of microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, v. 77, n.2, p. 504-518, 1996.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.474-491, 1992.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação.** Editora SBG, Ribeirão Preto, SP, 2008.

GIACOMONI, E.H. **Variabilidade genética em duas raças de eqüinos (*Equus caballus* – Equidae) – Crioulo e Pantaneiro – Avaliada através do marcador de DNA microssatélite.** Porto Alegre, 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GONELA, A. **Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada).** Ribeirão Preto, 2003. 88p. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GONGORA, J. *et al.* Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal Genetics**, v.33, p.312-327, 2002.

GONGORA J.; MORAN, C. Nuclear and mitochondrial evolutionary analyses of Collared, White-lipped, and Chacoan peccaries (Tayassuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n.34, p.181-189, 2005.

GOTTDENKER, N.; BODMER R. E. **Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon.** Journal of Zoology, London. 245: 423-430, 1998.

JÁCOMO, A. T. A. **Ecologia manejo e conservação do queixada *Tayassu pecari* no parque nacional das emas e em propriedades rurais de seu entorno.** Brasília, 2004. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília.

JESUS, D. P. Avaliação da Variabilidade Genética em *Tayassu pecari* (queixada) Através de Marcadores Microssatélites. Curitiba 2012. Monografia. Universidade Federal do Paraná.

KALB, A. L. **Avaliação da Variabilidade Genética em *Tayassu pecari* (Queixada) Através de Marcadores Microssatélites.** 19 p. Relatório de Iniciação Científica. Departamento de Genética – Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

KEUROGHLIAN, A. *et al.* **Avaliação do Risco de Extinção do Queixada.** Biodiversidade Brasileira. Ano II, Nº 3, 84-102, 2012.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c).** 2001. Programa distribuído livremente pelos autores no site <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html2001>>. Windows 95/NT.

LI, YOU-CHUN; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A; N EVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology** n.11, p.2453-2465, 2002.

Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Disponível em <<http://www.pr.gov.br/iap>> Último acesso em 22/03/2012.

LOWDEN, S. *et al.* The application of *Sus scrofa* microsatellite markers to wild suiformer. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.3, p.347-350, 2002.

MANGINI, P.R. - **Estudo dos níveis séricos de progesterona e estradiol e da estrutura do trato genital feminino de queixada (*Tayassu pecari*, Link, 1975).** Curitiba, 1999. 16p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná.

MARCH, I.J. 1993. **The White-lipped Peccary (*Tayassu pecari*). Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan.** Disponível em <<http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/1993-055.pdf>> Último acesso em 22/03/2012.

MEDRANO, J.F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v.8, n.1, p.43, 1990.

MOORE, S.S. *et al.* The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

PEREZ-SWEENEY, BM.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. **Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação.** In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação da Vida Silvestre.** Curitiba: Editora da UFPR, 2004. p. 343-380.

REIS, N.R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. de. **Mamíferos do Brasil.** Londrina: N. R. Reis; A.L. Peracchi; W. A. P.; I. P. Lima, 2006. p437.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J-M; ROESLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.1: A software for population genetic data analysis.** Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SILVA, R. W. – **Avaliação da variabilidade genética em *Tayassu tajacu* (CATETO) E *Tayassu pecari* (QUEIXADA) através de marcadores microssatélites.** Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Paraná.

SILVA, R. W., T. R. O. FREITAS, AND I. J. SBALQUEIRO. **Evaluation of genetic variability in the collared peccary *Pecari tajacu* and the white-lipped peccary *Tayassu pecari* by microsatellite markers.** Genetics and Molecular Biology 33:62–67, 2010.

SOARES, L.F. *et. al.* **Sabia: Soluções automatizadas em bioinformática utilizando inteligência artificial.** Software distribuído livremente pelos autores no site < <http://www.bioinfo.ufpr.br/sabia/>> Universidade Federal do Paraná, 2010.

SUN, H.; KIRKPATRICK, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellite conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, n.7, p.128-132, 1996.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TEGELSTROM, H. Detection of mitochondrial DNA fragment. In: Hoelzel, A.R. (ed.) **Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical approach**. Oxford: Irl Press, 1992. p.89-113.

TELLES, M.P.C. *et al.* Avaliação do padrão de amplificação de marcadores RAPD em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.1, p.7-14, 2003.

Tese Mieb. Disponível em

<https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/274/10/MATERIAIS%20E%20METODOS.pdf>> Último acesso em 10/08/2012.

The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em

<<http://www.iucnredlist.org/details/41778/0>> Último acesso em 07/08/2012.

THEIMER. T. C.; KEIM P. **Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences**. Journal of Mammalogy, 79:566-572, 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba, 2007.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, n.38, p.1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, n.15, p.323-354, 1951.

ANEXO

	SW1408		SW1928		SW1407		SW857		SW2411		ACTG2		ALOX12A		CGA		IGF-1		SW444		TNFB	
	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
QUEIXADAS	Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava																					
2 - MACHO	132	132	144	144	112	112	132	132	200	220	124	134	133	133	148	148	241	241	98	98	228	228
3 - MACHO	132	132	138	138	112	112	132	132	222	222	130	130	133	133	148	148	245	245	98	98	228	228
*4 - MACHO	130	130	?	?	?	?	?	?	188	222	130	130	?	?	?	?	245	245	98	98	228	228
*5 - FÊMEA	132	132	?	?	?	?	?	?	222	222	120	132	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
6 - MACHO	132	132	140	140	112	112	132	132	186	196	120	130	138	138	148	148	245	245	?	?	228	228
7 - MACHO	130	136	136	136	112	112	132	132	212	224	124	132	138	138	148	148	245	245	98	98	228	228
8 - FÊMEA	130	136	138	138	112	112	130	132	196	222	130	130	146	146	?	?	245	245	98	98	228	228
*10 - MACHO	132	132	?	?	?	?	?	?	196	222	130	130	?	?	146	146	245	245	?	?	176	176
12 - MACHO	132	132	138	138	112	114	136	136	220	228	120	130	142	142	144	144	245	245	96	98	174	174
13 - MACHO	132	138	140	140	114	114	132	132	186	196	120	130	140	140	144	144	245	245	92	92	176	176
14 - FÊMEA	132	132	144	144	112	112	130	130	188	220	120	130	140	140	144	144	245	245	108	108	228	228
15 - MACHO	132	138	140	140	112	114	132	132	198	224	120	130	136	136	144	144	245	245	108	108	180	180
*16 - MACHO	132	132	140	140	?	?	?	?	222	222	120	130	138	138	?	?	?	?	?	?	?	?
17 - MACHO	132	138	140	140	112	112	140	140	222	222	130	130	140	140	148	148	245	245	108	108	176	176
QUEIXADAS	Fazenda Experimental Galha Azul, Fazenda Rio Grande																					
*19 - MACHO	132	132	?	?	?	?	?	?	224	224	130	130	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
20 - MACHO	132	132	138	138	114	114	130	130	188	188	130	130	139	139	148	148	245	245	108	108	174	174
21 - MACHO	132	138	148	148	112	114	130	130	198	224	122	130	139	139	148	148	245	245	122	122	174	174
*22 - FÊMEA	132	132	?	?	114	114	130	130	188	188	130	130	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
23 - FÊMEA	132	138	144	144	112	112	130	130	198	198	130	130	?	?	148	148	245	245	108	108	226	226
24 - FÊMEA	132	138	142	142	112	112	130	130	200	200	130	130	137	137	146	146	245	245	108	108	174	174
25 - FÊMEA	130	130	142	142	114	114	130	130	188	200	122	130	137	137	148	148	245	245	108	108	176	176
26 - FÊMEA	130	130	142	142	120	120	140	140	200	200	118	130	141	141	146	146	245	245	108	108	176	176
*27 - MACHO	130	130	?	?	?	?	?	?	198	198	122	130	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
28 - MACHO	130	130	142	142	114	114	136	136	188	188	122	130	139	139	140	140	245	245	122	122	176	176
*29 - FÊMEA	130	130	?	?	?	?	?	?	188	188	130	130	?	?	?	?	?	?	?	?	?	178

OBS: Em negrito, são os machos que possuem alelos específicos da população do cativo;

O asterisco indica os indivíduos que foram excluídos na análise parcial de Heterozigosidade Esperada e Observada.